



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑩ **Offenlegungsschrift**
DE 197 44 649 A 1

②1 Aktenzeichen: 197 44 649.3
②2 Anmeldetag: 9. 10. 97
④3 Offenlegungstag: 15. 4. 99

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 M 1/34
C 12 Q 1/00
G 01 N 35/00
B 01 L 3/02
B 01 L 3/00

DE 197 44 649 A 1

⑦1 Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung eV, 80636 München, DE

⑦4 Vertreter:
München . Rösler Anwaltskanzlei, 80689 München

⑦2 Erfinder:
Meyer, Jörg-Uwe, Dr., 66386 St Ingbert, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
DE 38 05 808 A1
US 56 43 742
US 53 10 674
US 52 29 163
US 45 99 315
JP 05-3 17 030 A

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Zur Zelluntersuchung mit Hilfe der Patch Clamp-Methode bestimmte Vorrichtung und Verfahren

⑤7 Beschrieben werden eine zur Zelluntersuchung mit Hilfe der Patch Clamp-Methode bestimmte Vorrichtung sowie ein dazu bestimmtes Verfahren.

Die Vorrichtung ist mit einer flächigen Anordnung einer ersten Anzahl von Mikroküvetten 1 zur Aufnahme von Zellen 2 und mit einer flächigen Anordnung einer zweiten Anzahl von Mikropipetten 3 versehen, die relativ zur flächigen Anordnung der Mikroküvetten positionierbar ist, um eine Vielzahl in den Mikroküvetten befindlicher Zellen gleichzeitig zu untersuchen.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Vielzahl von Zellen 2 angeordnet und mit Hilfe einer Vielzahl von Mikropipetten 3 eine Vielzahl angeordneter Zellen gleichzeitig untersucht.

Die Erfindung ermöglicht erstmals eine automatisierte und somit beschleunigte Durchführung einer Vielzahl von Untersuchungen, die nach bisheriger Technik nur manuell und unter großem Zeitaufwand durchgeführt werden können.

DE 197 44 649 A 1

Die Erfindung bezieht sich auf eine zur Zelluntersuchung mit Hilfe der Patch Clamp-Methode bestimmte Vorrichtung sowie auf ein dazu bestimmtes Verfahren.

Die Patch Clamp-Methode ist ein Verfahren, um bioelektrische Signale, namentlich das elektrische Potential im Innern einer Zelle und den durch ionische Transportprozesse, die sog. Ionenkanäle zustandekommenden Strom durch eine Zellmembran zu messen. Mit diesem Verfahren ist es heutzutage möglich, den Strom durch eine Zellmembran sogar separat für einen spezifischen Ionenkanal zu messen und dadurch Erkenntnisse über die Funktionsweise der Zellmembran zu gewinnen. Messungen mit Hilfe der Patch Clamp-Methode werden in der Neurowissenschaft vorgenommen, um die Wirkung von Pharmaka und Chemotherapeutika auf die Aktivität von Ionenkanälen zu erforschen.

Aus der Patch Clamp-Methode wurden verschiedene Varianten entwickelt, um die elektrische Leitfähigkeit in einzelnen Membranabschnitten zu bestimmen. Für die Untersuchung wird die Membran einer Zelle, üblicherweise einer Nervenzelle, mit einer als Mikropipette dienenden Glaskapillare anzugsaugt und je nach Variante auch durchstoßen, um das intrazelluläre Potential von typischerweise 1–500 mV mit einer in der Glaskapillare befindlichen Elektrode gegenüber einer Referenzelektrode zu messen. Dabei ist die Zelle mechanisch fest mit der Mikropipette verbunden und steht über ihre Membran mit der umgebenden Lösung in Kontakt. Gemäß einer anderen Variante wird ein angesaugter Teil einer Zellmembran von der Zelle abgetrennt, um dann die Leitfähigkeit dieses Membranstücks (patch) zu ermitteln. Bezüglich der Art der Membranabtrennung sind verschiedene Varianten geläufig, um das Membranstück für die nachfolgenden Messungen in beiderlei Orientierungen (inside-out patch bzw. outside-out patch) an der Mikropipette zu befestigen.

Die Messung des Potentials innerhalb der Zelle bzw. die Messung von Strömen durch die Zellmembran hindurch erfolgt mit Hilfe von Mikroelektroden, die sich innerhalb der Mikropipette befinden können oder mit Hilfe heutiger Verfahren wie der Dünnschichttechnik auf Substraten hergestellt werden, auf denen die zu untersuchenden Neuronen positioniert werden müssen.

Obwohl die Patch Clamp-Methode sich seit ihrer Einführung in der Neurowissenschaft zu einer Routinemessung in neurobiologischen Labors entwickelt hat, ist sie meßtechnisch äußerst anspruchsvoll und erfordert bislang noch eine mikroskopische Kontrolle des Eingriffs an der zu untersuchenden Zelle. Nachteilig ist dabei vor allem, daß dieses Verfahren für den Umgang mit der einzelnen Nervenzelle ein erhebliches Geschick und Feingefühl seitens des Operateurs voraussetzt; so müssen die Neuronen beispielsweise auf einem Substrat aufgesucht werden und gegebenenfalls auch unmittelbar an Mikroelektroden an der Substratoberfläche positioniert werden, um die erforderlichen Messungen durchführen zu können.

Infolge des manuellen Umgangs mit der einzelnen Zelle ist die Patch Clamp-Methode bislang mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden. Insbesondere bei der Untersuchung einer Vielzahl von Zellen ist dieser Nachteil um so gravierender, da die Zellen nach ihrer Isolierung vom Gewebe räumlich beliebig verteilt sind und aus diesem Grunde nur nacheinander aufgesucht, plaziert und untersucht werden können.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung sowie ein Verfahren bereitzustellen, um mit Hilfe der Patch Clamp-Methode eine Vielzahl von Zellen gleichzeitig zu untersuchen, die Untersuchung der Zellen zu

automatisieren und so auf die bislang erforderliche mikroskopische Kontrolle zu verzichten. Ferner soll die Untersuchung einer Vielzahl von Zellen auf kleinstem Raum ermöglicht und schließlich der für die Patch Clamp-Messung nötige Zeitaufwand drastisch minimiert werden.

Eine erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe ist für die Vorrichtung im Anspruch 1 und für das Verfahren im Anspruch 6 angegeben. Weiterbildungen der Erfindung sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Vorrichtung mit einer flächigen Anordnung einer ersten Anzahl von Mikroküvetten zur Aufnahme von Zellen und mit einer flächigen Anordnung einer zweiten Anzahl von Mikropipetten, die relativ zur flächigen Anordnung der Mikroküvetten positionierbar ist, um eine Vielzahl in den Mikroküvetten befindlicher Zellen gleichzeitig zu untersuchen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß ferner durch ein Verfahren gelöst, wonach eine Vielzahl von Zellen angeordnet wird und mit Hilfe einer Vielzahl von Mikropipetten eine Vielzahl angeordneter Zellen gleichzeitig untersucht wird.

Durch die systematische räumliche Anordnung sowohl der zur Aufnahme der Zellen bestimmten Mikroküvetten als auch der Mikropipetten wird es erstmals möglich, die Patch Clamp-Methode zu automatisieren und auf diese Weise zeit- und kostensparend durchzuführen. Die zu untersuchenden Neuronen werden von einer flächigen Anordnung von Mikroküvetten – in der Regel ein Substrat mit gleichmäßig verteilten Vertiefungen in seiner Oberfläche – aufgenommen und so auf exakt bestimmbar Positionen gehalten. Eine flächige Anordnung von Mikropipetten ermöglicht bei genauer Positionierung gegenüber der Anordnung der in den Mikroküvetten befindlichen Zellen die gleichzeitige Durchführung einer Vielzahl von Einzelmessungen, die bislang nur nacheinander und bei gleichzeitiger Beobachtung durch ein Mikroskop durchgeführt werden konnten. Die Mikropipetten bzw. Mikroküvetten können auf den entsprechenden Flächen auf engstem Raum angeordnet werden und ermöglichen so den Bau sehr kompakter Meßvorrichtungen. Die Küvetten und Pipetten werden auf den dafür vorgesehenen Flächen vorzugsweise regelmäßig verteilt, d. h. sie bilden bei festem gegenseitigem Abstand untereinander ein gleichmäßiges Raster. Die genaue Gestalt der Raster wird sich in der Praxis an Größe und Form der Mikropipetten bzw. der Mikroküvetten orientieren.

Eine erfindungsgemäß bevorzugte Ausführungsform der Vorrichtung sieht vor, daß die flächige Anordnung von Mikroküvetten ein der flächigen Anordnung von Mikropipetten angepaßtes, aber in mindestens einer Richtung kleineres Rastermaß besitzt und daß die Anordnung von Mikroküvetten und die Anordnung von Mikropipetten relativ zueinander seitlich versetzbar sind, um wiederholt eine Vielzahl von Zellen gleichzeitig zu untersuchen. Im einfachsten Fall einer regelmäßigen Anordnung entspricht der Abstand benachbarter Mikroküvetten einem ganzzahligen Bruchteil des Abstandes benachbarter, gegenüber den Mikroküvetten größerer Mikropipetten, wodurch eine wesentlich erhöhte Zahl von Zellen gleichzeitig aufgenommen werden kann als bei einer Anordnung gleich vieler Küvetten wie Pipetten. Die Anzahl gleichzeitiger Messungen ist nur noch durch die Größe der Mikropipetten bzw. durch die für sie vorgesehene Flächengröße begrenzt. Zur Untersuchung sämtlicher in den Mikroküvetten befindlicher Zellen sieht die entsprechende Ausführungsform des Verfahrens vor, daß die Vielzahl von Mikropipetten relativ zu einer Anordnung von Zellen versetzt wird und wiederholt eine Vielzahl angeordneter Zellen untersucht wird. Auf diese Weise kann die erfindungsgemäße Vielfachmessung in kurzen Zeitabständen wiederholt werden, ohne daß es eines zwischenzeitlichen Austausches

der Zellen bedarf. Dies führt zu einer weiteren Steigerung der Durchsatzzahlen.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sieht einen Mikromotor zum Positionieren und/oder zum Versetzen der Anordnung von Mikroküvetten und der Anordnung von Mikropipetten relativ zueinander vor. Der Mikromotor zum Absenken der Mikropipettenanordnung auf die Mikroküvettenanordnung und zum seitlichen Verfahren beider gegeneinander gewährleistet mit Hilfe der heutigen Feinmechanik und Mikrotechnologie den punktgenauen Kontakt von Neuronen und Pipetten, wodurch die vorgestellte Erfindung die erstmalige Untersuchung einer Vielzahl von Zellen ermöglicht. Dabei kann die Pipettenanordnung oder auch die Küvettenanordnung durch den Mikromotor verfahren werden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sieht eine Zellzuführeinrichtung und/oder eine Spüleinrichtung zum Entfernen von Zellen vor. Dies führt zu einer weiteren Automatisierung der Messungen und damit zu einer weiteren Zeitersparnis insbesondere im Falle einer Vielfachmessung, die die Aufnahmekapazität der Küvettenansammlung übersteigt.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sieht einen Filter auf der Rückseite der Anordnung der Mikroküvetten vor. Da die zu untersuchenden Zellen von der der Pipettenanordnung zugewandten Seite aus in die Mikroküvetten eingebracht werden und die Mikroküvetten vorzugsweise in Richtung der Pipetten konisch aufgeweitet sein können, um die Zellen sicher aufzunehmen, empfiehlt sich eine Spülung der Küvettenanordnung von der Rückseite her. In diesem Fall ist ein Filter vorteilhaft, um ein Verstopfen der Mikroküvetten durch kleine Partikel zu verhindern.

Die Erfindung wird nachstehend ohne Beschränkung des allgemeinen Erfindungsgedankens anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die Zeichnungen exemplarisch beschrieben, auf die im übrigen hinsichtlich der Offenbarung aller im Text nicht näher erläuterten erfindungsgemäßen Einzelheiten ausdrücklich verwiesen wird. Es zeigen:

Fig. 1 einen Querschnitt durch eine erfindungsgemäßen Vorrichtung während der Patch Clamp-Messung.

Fig. 2 eine vergrößerte Detailansicht aus **Fig. 1**.

Fig. 3 einen Querschnitt einer erfindungsgemäßen Ausführungsform der Vorrichtung und

Fig. 4 eine perspektivische Ansicht der erfindungsgemäßen Anordnungen von Mikroküvetten und Mikropipetten.

Die **Fig. 1** und **2** zeigen schematisch eine erfindungsgemäße Vorrichtung während der Patch Clamp-Messung. Eine Mikroküvettenanordnung **1** weist eine Vielzahl im Raster angeordnet er Mikroküvetten zur Aufnahme einer Vielzahl von Zellen **2** auf. Einige der Zellen werden von einer Mikropipettenanordnung **3** berührt bzw. von den Mikropipetten angesaugt. Mit dieser Anordnung von $n \times n$ Pipetten können n^2 Messungen gleichzeitig durchgeführt werden. **Fig. 3** zeigt eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einem unterhalb der Mikroküvetten befindlichen Filter **4**, gleicht ansonsten der **Fig. 1**. Die räumliche Anordnung der Mikroküvettenanordnung (MKA) und der Mikropipettenanordnung (MPA) ist in **Fig. 4** dargestellt. Die MPA befindet sich über der MKA, wobei die spitz zulaufenden Öffnungen der Mikropipetten der MKA zugewandt sind. Die MPA kann durch einen nicht abgebildeten Mikromotor relativ zur MKA verfahren werden.

Für eine ungefähre Einschätzung der typischen Abmessungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden nachstehend ohne jegliche Beschränkung der Allgemeinheit einige exemplarische Zahlenangaben genannt:

Auf der Mikroküvettenanordnung von der Größe eines Quadratzentimeters befinden sich auf einer Fläche von $8 \times$

8 mm^2 entlang jeder Richtung des quadratischen Rasters 160 Küvetten und somit insgesamt 25600 Küvetten im gegenseitigen Abstand von $50 \mu\text{m}$. Die Mikropipettenanordnung weist auf einer Fläche von mindestens $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 16 im quadratischen Raster angeordnete Mikropipetten (Nozzles) mit einem gegenseitigen Abstand von $400 \mu\text{m}$ auf. Das Rastermaß der Mikropipettenanordnung entspricht hier also dem achtfachen Rastermaß der Mikroküvettenanordnung. Um alle in der MKA befindlichen Zellen zu untersuchen, kann die MPA in beiden Richtungen parallel zum MKA in 40 Schritten verfahren und damit in insgesamt 1600 unterschiedliche Positionen gebracht werden.

Mikroküvettenanordnung sowie Mikropipettenanordnung werden mit Hilfe lithographischer Methoden der Halbleitertechnik, die Elektroden der MPA in Dünnschichttechnik gefertigt. Mikromechanische Strukturen dienen zur Justierung des Motors; die Komponenten werden feinmechanisch und mikrotechnisch verbunden. Ein Mikroprozessor steuert die Mikroaktoren und erfaßt die anfallenden Meßdaten, die dann elektronisch ausgewertet werden.

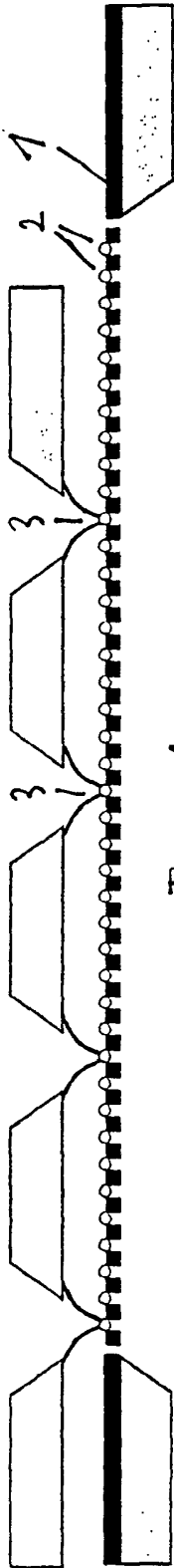
Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung und dem beschriebenen Verfahren können (derzeit) bereits einige Tausend Messungen in wenigen Minuten durchgeführt werden.

Patentansprüche

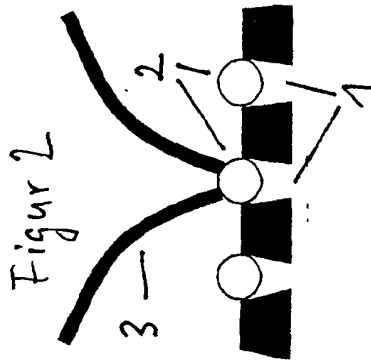
1. Zur Zelluntersuchung mit Hilfe der Patch Clamp-Methode bestimmte Vorrichtung mit einer flächigen Anordnung einer ersten Anzahl von Mikroküvetten (**1**) zur Aufnahme von Zellen (**2**) und mit einer flächigen Anordnung einer zweiten Anzahl von Mikropipetten (**3**), die relativ zur flächigen Anordnung der Mikroküvetten positionierbar ist, um eine Vielzahl in den Mikroküvetten befindlicher Zellen gleichzeitig zu untersuchen.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die flächige Anordnung von Mikroküvetten ein der flächigen Anordnung von Mikropipetten angepaßtes, aber in mindestens einer Richtung kleineres Rastermaß besitzt und daß die Anordnung von Mikroküvetten und die Anordnung von Mikropipetten relativ zueinander seitlich versetzbar sind, um wiederholt eine Vielzahl von Zellen gleichzeitig zu untersuchen.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch einen Mikromotor zum Positionieren und/oder zum Versetzen der Anordnung von Mikroküvetten und der Anordnung von Mikropipetten relativ zueinander.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet durch eine Zellzuführeinrichtung und/oder eine Spüleinrichtung zum Entfernen von Zellen.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch einen Filter (**4**) auf der Rückseite der Anordnung der Mikroküvetten.
6. Zur Zelluntersuchung mit Hilfe der Patch Clamp-Methode bestimmtes Verfahren, wonach eine Vielzahl von Zellen (**2**) angeordnet wird und mit Hilfe einer Vielzahl von Mikropipetten (**3**) eine Vielzahl angeordneter Zellen gleichzeitig untersucht wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Vielzahl von Mikropipetten relativ zu einer Anordnung von Zellen versetzt wird und wiederholt eine Vielzahl angeordneter Zellen untersucht wird.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

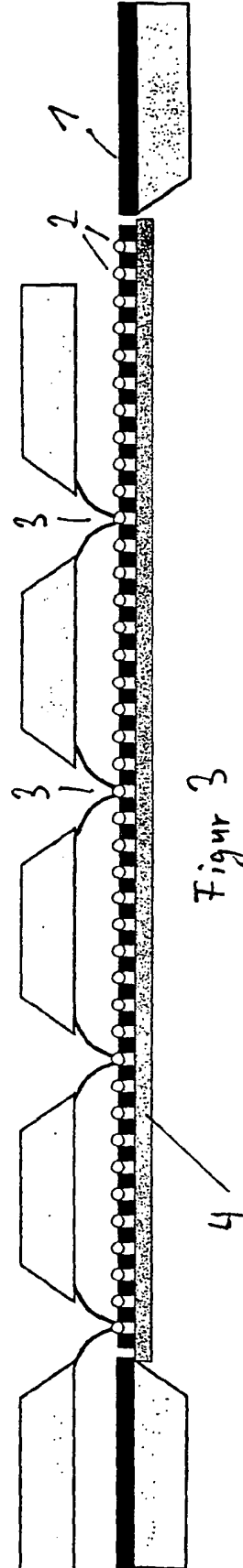
- Leerseite -



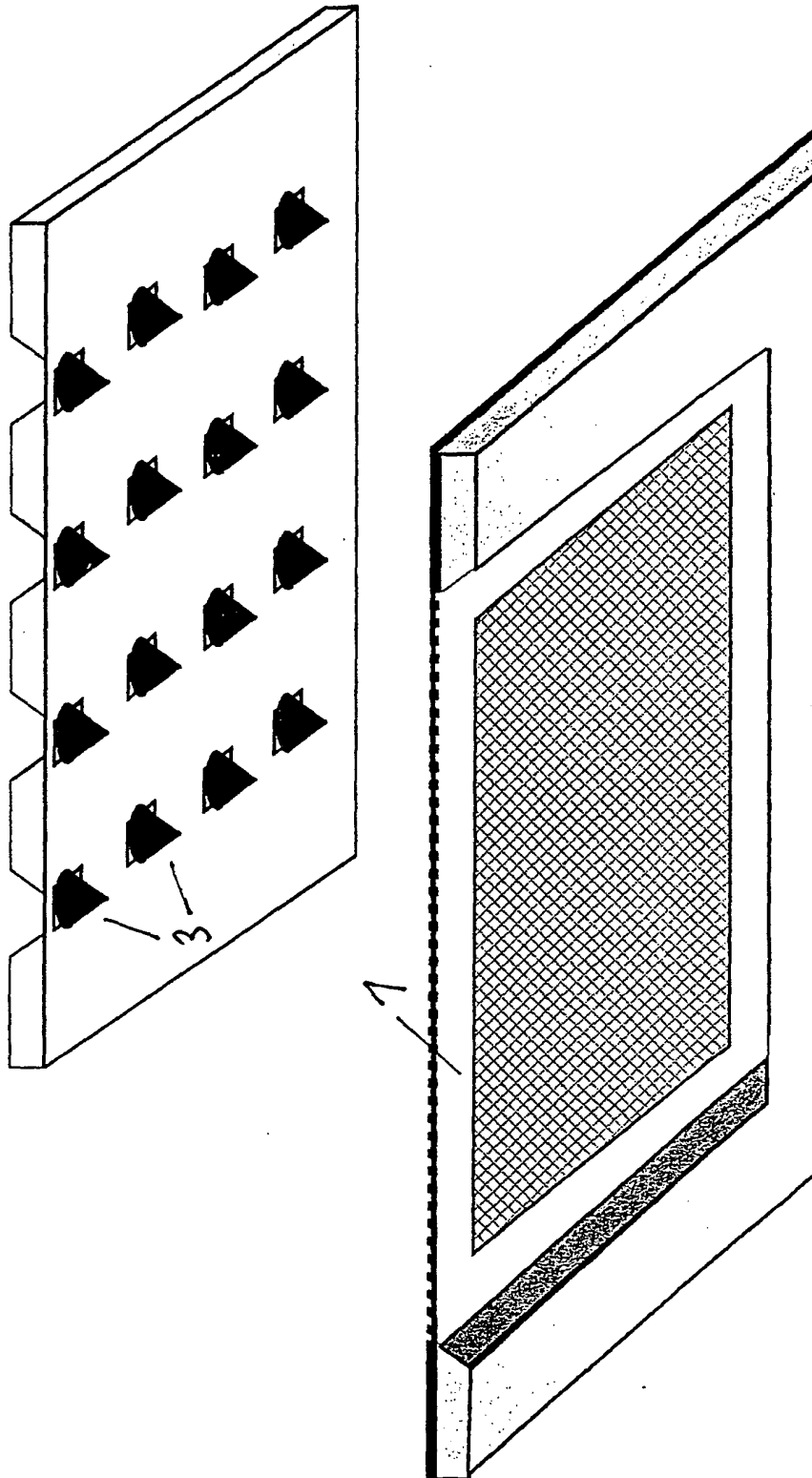
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4